

(English translation of the front page of the priority document)

Intellectual Property Office  
Ministry of Economic Affairs  
Republic of China

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder:

Application Date: June 11, 2003

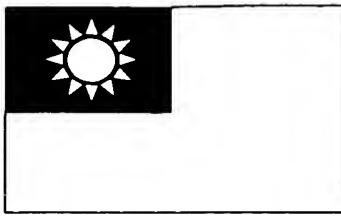
Application No.: 92115883

Applicant: Neupro Technology Co., Ltd.

Director General: TSAI, Lien-Sheng

Issue Date: October 6, 2003

Serial No.: 09220999300



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE  
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS  
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，  
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this  
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2003 年 06 月 11 日  
Application Date

申請案號：092115883  
Application No.

申請人：芯寶科技股份有限公司  
Applicant(s)

局長  
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 10 月 6 日  
Issue Date

發文字號：09220999300  
Serial No.

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92115883

※申請日期：92/06/11

※IPC 分類：

## 壹、發明名稱：(中文/英文)

(中文) 由微波促進蛋白質陣列製作之方法及全自動蛋白質陣列系統

(英文) Method of microwave-assisted protein array fabrication and full automatic protein array system

## 貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

(中文) 芯寶科技股份有限公司

(英文) Neupro Technology Co., Ltd.

代表人：(中文/英文)

翁祖增 / TSU-TSENG WENG

住居所或營業所地址：(中文/英文)

(中文) 台北市信義區基隆路一段 380 號 8 樓

(英文) 8F, 380, Sec. 1, Keelung Rd., 110 Taipei, R.O.C.

國 籍：(中文) 中華民國 (英文) R.O.C.

## 參、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

(1) 陳振漢 / CHEN, JENN-HAN ID: A121318008

(2) 楊承育 / YANG, CHENG-YU ID: F123865014

住居所地址：(中文/英文)

(中文) (1) 台北市汀州路三段 24 巷 2 弄 11 號 4 樓

(2) 台北市內湖區內湖路一段 323 巷 2 弄 2 號 5 樓

(英文)

國 籍：(中文) 中華民國 (英文) R.O.C.

#### 肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

## 伍、中文發明摘要：

本發明係利用微波技術縮短蛋白質陣列 (protein array) 製作及檢測時間之方法。蛋白質利用點製機 (arrayer) 點製在醛基高分子表面處理玻片上後，利用微波加熱技術，使蛋白質快速地固定在玻片表面。為了避免非專一性背景訊號出現，製作完成之蛋白質陣列以脫脂奶粉溶液並配合微波加熱以快速達到阻斷 (blocking) 作用的效果，繼而快速地得到高敏感度之蛋白質陣列之檢測結果。又，本發明亦將上述利用微波技術縮短蛋白質陣列製作及檢測時間之方法運用於全自動蛋白質陣列系統。

## 陸、英文發明摘要：

**柒、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1 ) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

**捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

無

## 玖、發明說明：

### 【發明所屬技術領域】

本發明係關於快速的蛋白質陣列製作之方法與全自動蛋白質陣列系統，且特別係關於由微波促進蛋白質陣列製作方法與全自動蛋白質陣列系統。

### 【先前技術】

為了要維持蛋白質之立體結構及其功能活性，要製造蛋白質陣列 (protein array) 或稱蛋白質晶片，相對上要比基因晶片複雜很多，有了基因晶片的技術為基礎，蛋白質晶片繼承了相關的技術平台而進一步向上發展，但仍需克服以下幾點關鍵技術，例如如何有效地固定蛋白質 (immobilize protein) 到晶片上、選取適當的捕捉蛋白質 (capture protein)、以及如何判讀實驗的結果等。

目前以玻璃為載體的蛋白質陣列 (晶片) 製造，主要是依據 Gavin MacBeath 及 Stuart Schreiber 在 2000 年，Science 289:1760-3 所發表的製作方法。將捕捉蛋白質以含有 40% 甘油的點製溶液 (spotting solution) 稀釋後，利用點製機 (arrayer) 點製在含醛基表面的玻片上，再於室溫或 4℃ 中靜置三小時或過夜，使得點上去的蛋白質可以固定在玻片上。

製作完成的蛋白質陣列在進行檢測步驟之前，需進行阻斷 (blocking) 步驟，以防止後續實驗出現高背景的情況。習知技術中阻斷作用所需時間多為一小時左右，整個利用蛋白質陣列檢測的過程需時至少 6 小時，或至隔天才能得

到判讀之結果。如此，在製作及檢測的過程中耗費許多時間。

### 【發明內容】

本發明利用微波能量移轉的方法，不但減少了蛋白質陣列製作時程，也縮短了阻斷作用所需時間。在製程方面，捕捉蛋白質無須加任何甘油之類的物質，在利用任何點製機點製在經醛基高分子表面處理的玻片上後，立即放入微波爐中以強微波加熱，即可加速蛋白質的固定。隨後，再將蛋白質陣列放入 PBSP(PBS 緩衝液加上脫脂奶粉其重量/體積為 2%)中以微波進行阻斷作用；之後以 PBST(PBS 緩衝液+Tween20，其重量/重量為 0.025%)，利用攪拌子攪動清洗，之後再以 PBS 緩衝液浸潤，離心甩乾後即可進行後續檢測實驗，或予以冷藏備用。檢測實驗係利用蛋白質互動(interaction)原理，如抗體與抗原間之結合、蛋白質與蛋白質之結合、或是酵素(enzyme)與基質(substrate)之結合等。結果顯示除了可以快速的方法製成蛋白質陣列外，同時並能兼具檢測之高敏感度，以及良好的保存特性。

### 【實施方式】

絕大部分的蛋白質及多肽類分子在結構的外圍都有大量裸露的帶正電胺基酸如 arginine 及 lysine，它們所含的  $\text{NH}_2$  胺基，當與表面具有活性醛基之載體(carrier)(如玻片)接觸時，胺基會與醛基產生化學反應，胺基氮原子上之電子對會與醛基上的碳原子反應，隨後透過脫水反應，便形成所謂的 Schiff 基共價結合，而使蛋白質固定於



載體上。利用此原理，不同的蛋白質可以被密集的微陣列點製成蛋白質陣列（晶片），並以例如免疫螢光反應法，檢測檢體中目標蛋白質表現情形。但是依習知技術之此實驗反應過程需要非常長的時間才能達到有效且具有可信度的結果。

本發明係改良並發展出新的實驗方法，可縮短蛋白質陣列（晶片）的製作及檢測時間，於 60 至 90 分鐘以內完成整個流程。

以微波方式輔助固定蛋白質分子於玻璃（或其他固態材質）載體的獨特技術，主要是加速上述之脫水反應而使蛋白質分子與醛基之間形成 Schiff 基共價鍵結。如圖 1a 之示意圖。

高頻率的微波不會造成分子的離子化 (ionization of molecules) 及化學鍵的破壞，而是引起雙極性分子如水分子，使其在溶液中前後移動或旋轉，再加上少部分的離子傳導機制，將使蛋白質溶液中分子之移動依電場方向排列，使得點製在玻片上的蛋白質具有一致的排列方向，同時微波作用可使得蛋白質結構改變而展開，如圖 1b 所示。此外，微波能量的移轉是從蛋白質溶液之內部中開始，而均勻地向外展開；加熱時載體本身並不會過度發熱，可避免一旦載體被加熱，蛋白質溶液會很快地被蒸發掉；最後，微波能量的移轉會隨著電源的關閉而立即停止，而不會有能量的繼續移轉，因此微波能量具有可加快蛋白質分子與玻片載體表面的官能基碰撞反應的速度之功能，使後續的

化學反應能更有效率。

因此本發明利用微波技術縮短蛋白質陣列 (protein array) 製作及檢測時間之方法，以抗原陣列 (antigen array) 為例，包含下列步驟：

- a. 將抗原蛋白以點製機點製於含醛基表面之玻片上；
- b. 將上述玻片以微波處理 30 至 90 秒，較佳為 50 至 70 秒；
- c. 加入進行阻斷 (blocking) 作用之 PBSM 緩衝液，其重量 / 體積為 2% 之脫脂奶粉於 PBS 緩衝液進行微波阻斷處理 1 至 5 分鐘，較佳為 2 至 4 分鐘；
- d. 分別以 PBST 緩衝液，其重量 / 重量為 0.025% 之 Tween20 於 PBS 緩衝液中，及以 PBS 緩衝液清洗，並以 1200 RPM 離心甩乾；
- e. 一級抗體 (稀釋於 PBSMT 緩衝液 (PBS 緩衝液、脫脂奶粉及 Tween 20)) 於室溫反應 30 分鐘，並重複步驟 d 清洗；
- f. 二級抗體 (稀釋於 PBSMT 緩衝液 (PBS 緩衝液、脫脂奶粉及 Tween 20)) 於室溫反應 30 分鐘，並重複步驟 d 清洗；以及
- g. 以晶片掃描儀判讀。

其中該微波強度的定義為頻率介於 300MHz 至 300GHz 之電磁波，其波長分別為 1mm 至 1m，應用於加熱的微波，其通常強度係介於  $2450\text{MHz} \pm 50\text{MHz}$ 。本發明使用之微波強度即為 2.00 至 3.00 GHz。

( (

更詳細的說明，本發明可應用於表面含醛基玻片（如 CEL Associates 及 Telechem International, Inc 製之表面含醛基玻片），或其他具類似表面結構的醛基塗層玻片、及多聚賴氨酸塗層玻片及 FAST 玻片（SS，硝化纖維）等。

此外，運用此技術可以快速地製成檢測個體中抗體之抗原陣列，抗原的種類可包括細胞萃取物、病毒感染細胞萃取物、cDNA 表現質體轉染（transfected）細胞萃取物、重組蛋白、重組噬菌體、多胜肽（polypeptides）等，運用範圍包括（1）、傳染病偵測如 B 型肝炎、C 型肝炎、SARS 冠狀病毒感染等；（2）、自體免疫疾病之檢測。

此技術也可製成抗體陣列（antibody array），即將抗體點製在玻片上後，運用在偵測檢體中之抗原。因此，此技術在臨床檢驗上亦可運用於一全自動化之蛋白質陣列系統。

以下配合實施例進一步說明本發明，但不應將其解釋為限制本發明之範圍。

（實施例 1：疱疹病毒抗原陣列）

抗原之取得：

以單純疱疹病毒第一型（HSV-1）的國際株 KOS 感染喉癌細胞（Hep-2）後，在顯微鏡下觀察是否有出現細胞病變現象（cytopathic effect；CPE），若有則以 5cc 之 PBS 緩衝液將細胞刮下，並以反覆冰凍解凍方式將細胞打破，離心後取上清液並測其蛋白質的濃度。

蛋白質陣列（晶片）之製法：

1. 將上述感染細胞萃取物取  $20\mu\text{l}$  加入 96 孔盤中，以 1 鋼針點製於醛基塗層玻片上；
2. 待點製完成，置入微波爐（SAMPO 公司，天廚）以能量強度  $2.45\text{GHz}$ （約  $800\text{W}$ ）進行微波加熱 60 秒；
3. 以 PBSM 緩衝液微波加熱 3 分鐘以進行阻斷作用；
4. 加入室溫之 PBST 緩衝液以攪動只攪動清洗 3 分鐘，之後再以 PBS 緩衝液浸潤 2 分鐘，離心  $1200\text{RPM}$  甩乾約 1 分鐘；
5. 加入受單純疱疹病毒第一型感染病患血清（一級抗體），於室溫反應 30 分鐘，然後重複進行步驟 4 之清洗動作；
6. 加入二級抗體，於室溫反應 30 分鐘，然後重複進行步驟 4 之清洗動作；
7. 以晶片掃描儀（Axon Genepix 4000B）判讀結果。

（比較例 1：製作及檢測時間之比較）

將實施例 1 中所製備的檢體樣品，以習知的方法（Science 2000, 289: 1760-1763; Nature Medicine 2002, vol. 8, No. 3）製作蛋白質陣列，步驟及反應間依下表所述：

表 1、習知蛋白質陣列製法之操作步驟及時間

習知蛋白質陣列製法步驟	反應時間
點製溶液 PBS 加上 40%甘油	3 小時至隔夜
阻斷作用溶液	1 小時以上
清洗溶液清洗及甩乾	30 至 40 分鐘
一級抗體反應	1 小時以上
清洗溶液清洗及甩乾	30 至 40 分鐘
二級抗體反應	1 小時以上
清洗溶液清洗及甩乾	30 至 40 分鐘

從點製檢體到送至晶片掃描儀判讀結果總時間至少需要 6 小時至隔天才能完成，而經微波促進之蛋白質陣列製法則可縮短至 60 至 90 分鐘以下。以微波處理之二步驟分別與傳統方法相對步驟所需時間比較如下表 2 所示：

表 2 製作蛋白質陣列所需時間之比較

製作方法	使用玻片	固定蛋白質時間	阻斷作用時間
習知方法	醛基塗層	3 小時以上	1 小時以上
微波促進法	醛基塗層	1 分鐘以內	3 分鐘以內

(比較例 2：蛋白質陣列檢測敏感度之比較)

以習知方法 (Science 2000, 289:1760-1763; Nature Medicine 2002, vol. 8, No. 3) 及微波促進法，分別將人類 IgG 作為抗原點製在醛基塗層玻片上，再加上以螢光劑 Cy3 或 Cy5 標記之兔子抗人類 IgG 抗體進行反應，最後以 Axon 4000B Laser Scanner 作訊號偵測。結果顯示，以不同濃度之人類 IgG 分別連續點製在玻片上六次，再分別以二種稀釋濃度的抗人類 IgG 抗體 (1:100 及 1:200) 進行反應，所得之螢光影像進行分析後，發現微波促進法較習知方法可得到略強的螢光強度，亦即微波促進法具有略高的偵測敏感性。

實驗結果如圖 2a、2b (習知方法) 及圖 2c、2d (微波促進法) 所示，不同濃度之人類 IgG 分別以二種稀釋濃度的抗體 (1:100 及 1:200) 進行反應，所得之螢光強度統計迴歸的結果，微波促進法之  $r^2$  值為 0.951 及 0.968，略高於習知方法之 0.942 及 0.950。

(實施例 2：蛋白質陣列之保存)

將無感染及感染單純疱疹病毒之細胞由培養瓶中刮下，以反覆冰凍解凍方式將細胞打破，將該細胞萃取物分別點製在玻片上連續四次共四片，點製完成後將玻片微波 30 至 90 秒，之後於 4℃ 冰箱中分別儲藏一天、一週、一個月及二個月。當儲存時間到達之後，分別取出以一級抗體 (小鼠抗疱疹病毒第一型 gD 抗體)，及二級抗體 (以螢光劑 Cy3 標記之兔子抗小鼠 IgG 抗體) 進行免疫反應，結果如圖 3 所示，經微波處理過後之蛋白質陣列至少可以儲存二個

月仍可保存抗原的穩定性。若再經防腐劑的使用及/或儲存於-20℃以下，儲存時間應可再延長至六個月以上。

此外，本發明之蛋白質陣列快速製作方法除了操作時間短外，尚具有另一項特色，即從點製樣品至晶片掃描之過程，可大量且同時進行。本發明亦可運用於「全自動化蛋白質陣列系統」之研發及應用，將可節省大量的時間及耗材，可運用在臨床檢驗。因此該「全自動化蛋白質陣列系統」主要包含以下部分：

電腦管理裝置（10）；

編碼裝置（20），可將待測玻片（11）貼上條碼以提供檢體資訊；

冷藏裝置（30），以儲存欲被點製之抗原或抗體；

機器手臂裝置（40），可分別進行點製樣品之動作；

微波裝置（50），可加速固定蛋白質及阻斷作用的時間；

微量分注裝置（60），可將蛋白質陣列進行一連串清洗、抗體抗原反應等免疫染色實驗步驟；及

晶片判讀裝置（70），可掃描免疫染色檢測結果之訊號。

該全自動蛋白質陣列系統之檢測流程，如圖4之方塊圖，將電腦管理裝置（10）連結至上述各個裝置，以軟體控制及設定各檢測步驟流程，首先將各待製作之玻片（11）於編碼裝置（20）貼上特定條碼，隨後機器手臂裝置（40）會根據輸入之檢測項目至冷藏裝置（30）中沾取抗原或抗體並進行點製動作。點製完畢，蛋白質陣列隨即送入微波裝置（50）以微波固定蛋白質及後續阻斷作用，並輔以加

入試劑時可分隔玻片上檢體之分隔構件(12)，以微量分注裝置(60)吸取試劑容器(61)中之緩衝試劑及偵測抗體進行各實驗步驟，完成後於晶片判讀裝置(70)進行掃描判讀結果，並於電腦管理裝置(10)中進行分析，如此將可大大節省人力，並減低人為操作的誤差。

此外，由於本發明之快速蛋白質陣列製作方法可運用於各種蛋白質檢體，將其固定及阻斷作用的製作程序可由約4小時縮短為數分鐘，更可略提高偵測敏感度。因此本發明所揭露之方法之應用範圍已涵蓋目前蛋白質陣列所常用之各種檢體，其廣泛應用性(如上述實施例)可應用於現有蛋白質陣列之製作過程之改良，進而縮短大部分之蛋白質陣列檢測之時間。

現今的生醫感測器研發以多功能、微小化，及平行處理等陣列或晶片概念為主軸，以提供封閉式無菌反應條件，並具有下列如高產量及多目標平行分析能力、需樣品與化學藥品量少、分析速度快、反應及偵測速度提高、分析系統輕便、與成本低，可直接應用於現場診斷節省時間等特點為發展目標，「全自動蛋白質陣列系統」則提供了符合上述條件之一快速簡便的感測設備。

本發明可在不離開本發明之精神及基本特徵下作成各種特定之例示。本發明之範圍為由隨附之申請專利範圍所限定，而並非由上述說明所限制，所有與申請專利範圍意義相等之變化均應包含於本發明中。

#### 【圖示簡單說明】



圖 1(a)表示蛋白質胺基會與玻片上醛基產生化學反應，胺基氮原子上之電子對會與醛基上的碳原子反應，隨後透過脫水反應，便形成所謂的 Schiff 基共價結合，而使蛋白質固定於載體上；

圖 1(b)為微波促使蛋白質排列方向一致性及結構展開之示意圖。

圖 2(a)為以習知方法對不同濃度之人類 IgG 以稀釋濃度 1:100 的抗體進行反應，所得之螢光強度統計迴歸的結果；

圖 2(b)為以習知方法對不同濃度之人類 IgG 以稀釋濃度 1:200 的抗體進行反應，所得之螢光強度統計迴歸的結果；

圖 2(c)為以微波促進法對不同濃度之人類 IgG 以稀釋濃度 1:100 的抗體進行反應，所得之螢光強度統計迴歸的結果；

圖 2(d)為以微波促進法對不同濃度之人類 IgG 以稀釋濃度 1:200 的抗體進行反應，所得之螢光強度統計迴歸的結果。

圖 3 為經微波處理過後之蛋白質陣列於 4℃ 冰箱中儲藏一天、一週、一月、二月的結果。

圖 4 為全自動蛋白質陣列系統之檢測方塊圖。

(元件符號說明)

- 10 電腦管理裝置
- 11 玻片
- 12 分隔構件
- 20 編碼裝置

- (
- (
- 30 冷藏裝置
  - 40 機器手臂裝置
  - 50 微波裝置
  - 60 微量分注裝置
  - 61 試劑容器
  - 70 晶片判讀裝置

## 拾、申請專利範圍：

1. 一種由微波促進蛋白質陣列製作之方法，其方法包含下列步驟：

將蛋白質點製於含醛基表面之玻片，以製成蛋白質陣列，

將蛋白質陣列放入 PBSM(PBS 緩衝液加上脫脂奶粉其重量/體積為 2%) 中進行阻斷作用，

以 PBST(PBS 緩衝液+Tween20，其重量/重量為 0.025%) 清洗，

再以 PBS 緩衝液浸潤，離心甩乾後進行檢測實驗，或予以冷藏備用；

其特徵在於以微波方式固定點製陣列，及以微波方式加速阻斷作用。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該微波強度為 2.00 至 3.00 GHz。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其微波固定點製陣列的時間為 30 至 90 秒。

4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其微波加速阻斷作用之時間為 1 至 5 分鐘。

5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，可運用在含醛基表面玻片及、多聚賴氨酸塗層玻片及 FAST 玻片(SS，硝化纖維)等。

6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，該蛋白質種類包括各式抗體、抗原及基質(substrate)。

7. 一種全自動蛋白質陣列系統，包含：

一電腦管理裝置，對該全自動蛋白質陣列系統設定檢測流程，及分析掃描結果，並輸出結果報告；

一編碼裝置，由該電腦管理裝置之設定，將一待製備玻片貼上條碼，作為對應檢體偵測結果之資訊儲存管理；

一冷藏裝置，由該電腦管理裝置之設定，冷藏儲存欲被點製之蛋白質，如抗原或抗體；

一機器手臂裝置，由該電腦管理裝置設定點製流程，從該冷藏裝置中取蛋白質樣品，並將其點製於該編碼後之玻片；

一微波裝置，由該電腦管理裝置設定微波強度及時間，將該蛋白質固定於該玻片上，並進行阻斷作用；

一微量分注裝置，由該電腦管理裝置設定檢測流程，將該玻片進行清洗、抗體抗原反應等免疫染色實驗操作；及

一晶片判讀裝置，掃描該玻片之免疫染色檢測結果，並將檢測之訊號送至該電腦管理裝置。

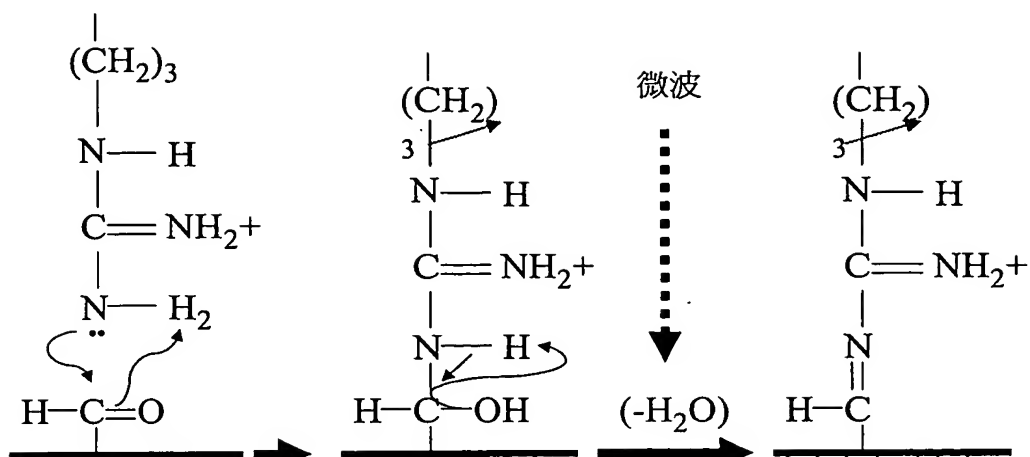
(

(

拾壹、圖式：

圖 1

(a)



(b)

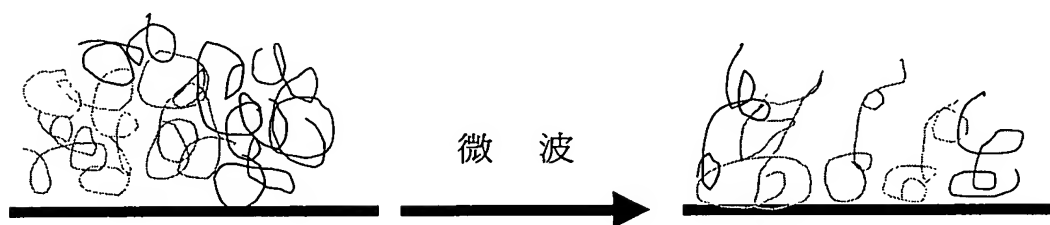
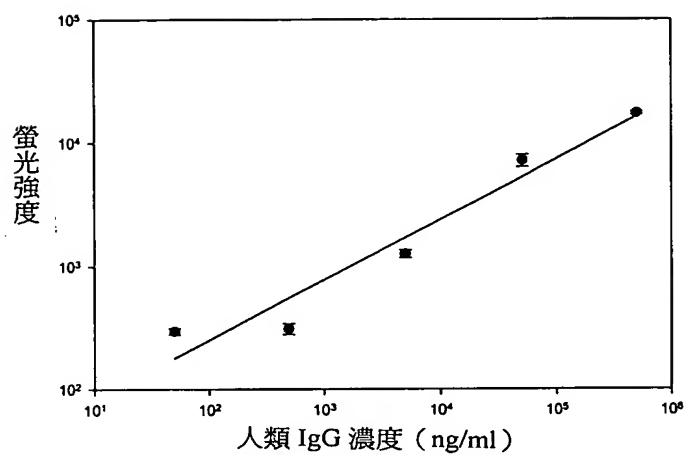


圖 2

(a)

習知方法 (Cy3 標記之抗人類 IgG 抗體 1/100)

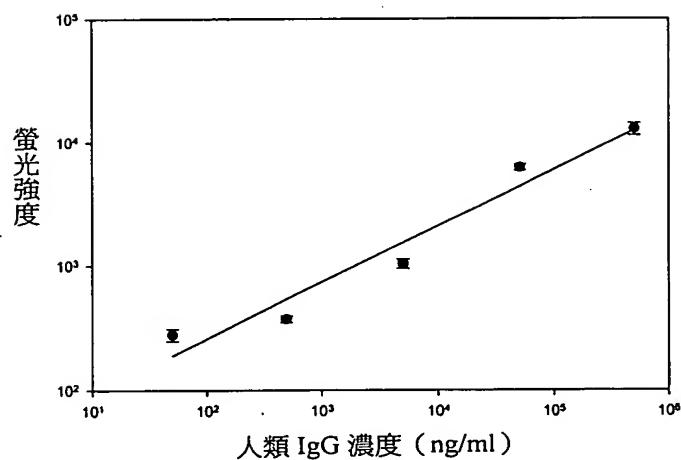


$$Y = 0.49 X + 1.42$$

$$r^2 = 0.942$$

(b)

習知方法 (Cy3 標記之抗人類 IgG 抗體 1/200)



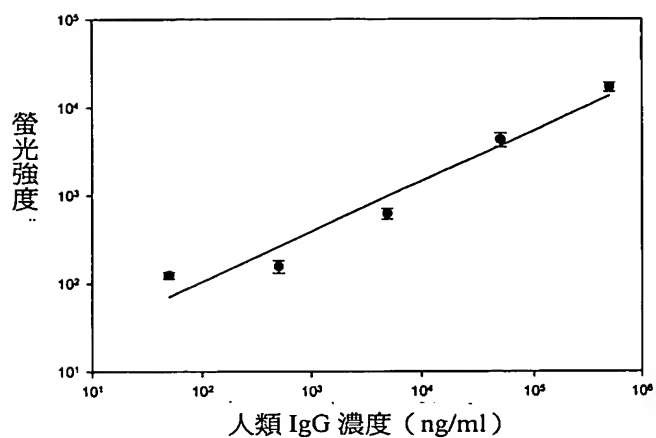
$$Y = 0.46 X + 1.5$$

$$r^2 = 0.950$$

圖 2

(c)

微波促進法 (Cy3 標記之抗人類 IgG 抗體 1/100)

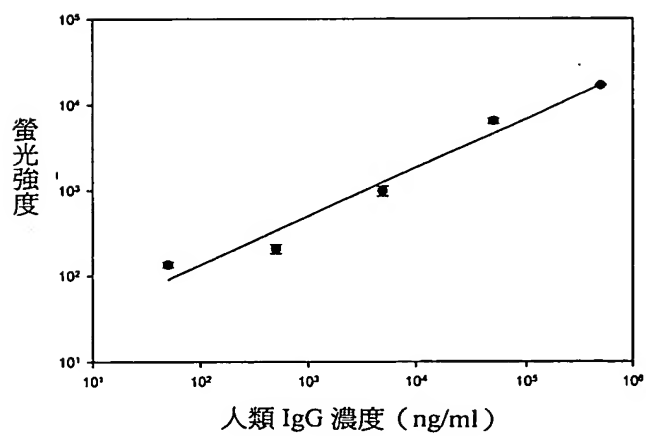


$$Y = 0.57 X + 0.88$$

$$r^2 = 0.951$$

(d)

微波促進法 (Cy3 標記之抗人類 IgG 抗體 1/200)

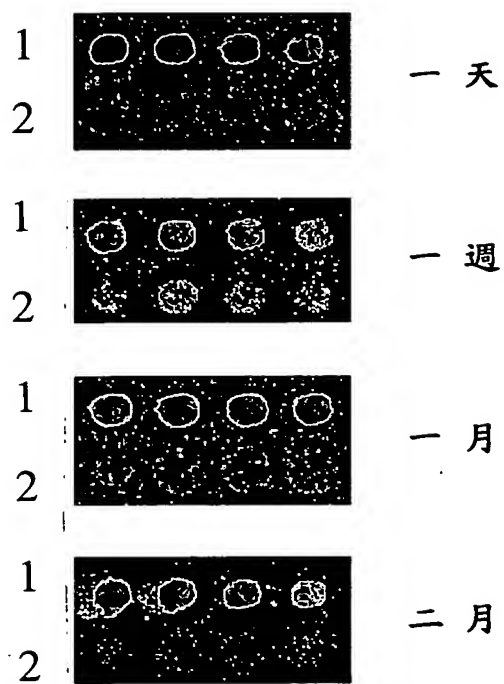


$$Y = 0.57 X + 0.99$$

$$r^2 = 0.968$$



圖 3



1 : 單純疱疹病毒感染細胞萃取物

2 : 無感染細胞萃取物

圖 4

